

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

Patente & Lizenzen



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. November 2000 (23.11.2000)

EINGANG

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

PCT

WO 00/69455 A3

not sk

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/86,  
A61K 39/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04011

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Mai 2000 (04.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 22 407.2 14. Mai 1999 (14.05.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEBER, Olaf  
[DE/DE]; Langendorfer Strasse 15, D-42489 Wülfrath  
(DE). SIEGLING, Angela [DE/DE]; Claudiusweg 7,  
D-42115 Wuppertal (DE). SCHLAPP, Tobias [DE/DE];  
Gerstenkamp 10, D-51061 Köln (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-  
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 5. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ORGAN, TISSUE AND CELL-SPECIFIC IMMUNO-THERAPEUTIC FOR CHRONIC VIRAL INFECTIONS AND  
INFLAMMATORY, DEGENERATIVE AND PROLIFERATIVE DISEASES, IN PARTICULAR OF THE LIVER, AND FOR CAN-  
CER, BASED ON A RECOMBINANT PARAPOX VIRUS

(54) Bezeichnung: ORGAN-, GEWEBS- UND ZELLSPEZIFISCHES IMMUNTHERAPEUTIKUM FÜR CHRONISCHE VI-  
RALE INFESTIONEN, SOWIE ENTZÜNDLICHE, DEGENERATIVE UND PROLIFERATIVE ERKRANKUNGEN INSBE-  
SONDERE DER LEBER SOWIE KREBS AUF DER BASIS VON REKOMBINANTEM PARAPOXVIRUS

(57) Abstract: The invention relates to the production and use of organ, tissue and/or cell-specific, recombinant parapox virus  
ovis as a targeted immuno-therapeutic which is pathogen and organ-specific for treating chronic viral infections and inflammatory,  
degenerative, proliferative diseases, in particular of the liver and for treating cancer.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezi-  
fischem rekombinanten Parapoxvirus ovis als Erreger- und organspezifisches, zielgerichtetes Immuntherapeutikum für chronische  
virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative, proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber, und Krebs.

WO 00/69455 A3



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b><br><b>A61K 39/00</b>  | <b>A2</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/69455</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 23. November 2000 (23.11.00)  |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/04011<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 4. Mai 2000 (04.05.00)<br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>199 22 407.2 14. Mai 1999 (14.05.99) DE<br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).<br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WEBER, Olaf [DE/DE]; Langendorfer Strasse 15, D-42489 Wülfrath (DE). SIEGLING, Angela [DE/DE]; Claudiusweg 7, D-42115 Wuppertal (DE). SCHLAPP, Tobias [DE/DE]; Gerstenkamp 10, D-51061 Köln (DE).<br><b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).   |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| <b>(54) Title:</b> ORGAN, TISSUE AND CELL-SPECIFIC IMMUNO-THERAPEUTIC FOR CHRONIC VIRAL INFECTIONS AND INFLAMMATORY, DEGENERATIVE AND PROLIFERATIVE DISEASES, IN PARTICULAR OF THE LIVER, AND FOR CANCER, BASED ON A RECOMBINANT PARAPOX VIRUS<br><b>(54) Bezeichnung:</b> ORGAN-, GEWEBS- UND ZELLSPEZIFISCHES IMMUNTHERAPEUTIKUM FÜR CHRONISCHE VIRALE INFESTIONEN, SOWIE ENTZÜNDLICHE, DEGENERATIVE UND PROLIFERATIVE ERKRANKUNGEN INSBESONDERE DER LEBER SOWIE KREBS AUF DER BASIS VON REKOMBINANTEM PARAPOXVIRUS<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention relates to the production and use of organ, tissue and/or cell-specific, recombinant parapox virus ovis as a targeted immuno-therapeutic which is pathogen and organ-specific for treating chronic viral infections and inflammatory, degenerative, proliferative diseases, in particular of the liver and for treating cancer.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezifischem rekombinanten Parapoxvirus ovis als Erreger- und organspezifisches, zielgerichtetes Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative, proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber, und Krebs.</p> |           |   |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         | ML | Mali   | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | MN | Mongolei   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MR | Mauretanien  | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MW | Malawi   | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MX | Mexiko   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | PL | Polen  |    |                                   |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |
| EE | Estland                      |    |                                      |    |  |    |                                   |

Organ-, gewebs- und zellspezifisches Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative und proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber sowie Krebs auf der Basis von rekombinantem Parapoxvirus

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und den Einsatz von rekombinantem Parapoxvirus zur organ-, gewebs-und/oder zellspezifisch zielgerichteten Immuntherapie von viralen Infektionen, sowie entzündlichen, degenerativen, proliferativen Erkrankungen, insbesondere der Leber, und Krebs. Sie betrifft weiter die Verwendung von rekombinantem Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften zur Herstellung von Arzneimitteln.

15

In den Anwendungsbereich der oben genannten Parapoxviren fallen auch Erkrankungen der Haut und ihrer Anhangsgebilde, der inneren Organe, des Zentralnervensystems und seiner Anhangsgebilde einschließlich des Auges, sowie Krebs, bei Mensch und Tier.

20

25

Es ist bekannt, dass latente und chronisch persistente virale Infektionen durch eine Immunsuppression aktiviert bzw. reaktiviert werden können, oder umgekehrt, dass das Immunsystem die akute Erkrankung, die durch ein Virus, das latent ist, hervorgerufen werden kann, unterdrückt (z.B. rekurriert eine latente Herpesvirus-Infektion bei Immunsuppression: Lippenbläschen bei Stress oder Kortisongabe). Es ist weiter bekannt, dass chronisch persistente und latente virale Infektionen schwer oder garnicht mit herkömmlichen antiviralen Substanzen auf niedermolekularer Basis therapierbar sind.

30

Ein Grund dafür kann die fehlende virale enzymatische Aktivität bei solchen Infektionen sein (beispielsweise das Fehlen einer viralen Polymerase-Aktivität, die einen nukleosidischen Inhibitor erst in die virale Nukleinsäure einbauen muss, damit dieser z.B. zum Kettenabbruch in der viralen DNA führen kann; beispielsweise das

Fehlen einer viralen Thymidinkinase-Aktivität, die z.B. eine antivirale Verbindung erst phosphorylieren muss, damit diese aktiv werden kann) oder aber die fehlende Erkennung infizierter Zellen oder viraler Antigene durch das Immunsystem des Wirtes.

5

Bekannt ist ebenfalls, dass bei chronisch persistierenden viralen Infektionen eine Superinfektion mit einem anderen Virus zu antiviralen, gegen das chronisch persistierende Virus gerichteten Effekten führen kann. 1) Die Abhängigkeit dieses Effektes von Interferonen (v.a. IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$ , die von T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen sezerniert werden, konnte von den Autoren gezeigt werden.

10

15

Die Ergebnisse dieser Autoren bestätigte eine andere frühere Studie, in der gezeigt wurde, dass Class-I-restringierte cytotoxische T-Zellen die hepatozelluläre HBV-Genexpression in HBV- transgenen Mäusen hemmen konnten, dass dieser Prozess ohne Zerstörung der Leberzellen ablief und dass der Prozess durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ - hervorgerufen wurde <sup>2)</sup>.

20

In der tiermedizinischen Praxis wird seit längerer Zeit ein Produkt zur Induktion „paraspezifischer Immunität“, ein sogenannter Paramunitätsinducer therapeutisch, meta- und prophylaktisch eingesetzt. Diese Paramunitätsinducer bestehen z.B. aus chemisch inaktiviertem Parapoxvirus ovis. Ein auf der Basis dieses Virus (Parapoxvirus ovis, Strain D 1701) hergestelltes Produkt ist BAYPAMUN<sup>®</sup> (DE 3504940).

25

Das inaktivierte Virus induziert im Tier einen unspezifischen Schutz gegenüber Infektionen mit den verschiedensten Erregern. Man nimmt an, dass dieser Schutz über verschiedene Mechanismen des organismus-eigenen Abwehrsystems vermittelt wird.

30

Dazu zählen: Induktion von Interferon, Aktivierung der natürlichen Killerzellen, Induktion der „Kolonien-Stimulierenden Aktivität“ (CSA), sowie Stimulierung der

Lymphozytenproliferation. Frühere Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten die Stimulation von Interleukin 2 und Interferon- $\gamma$ <sup>3)</sup>.

5 Bekannt ist ebenfalls, dass Parapoxviren als Vektoren mit Genen von anderen Erregern versehen werden können, um entsprechende Proteine exprimieren zu können und so einen prophylaktischen Immunschutz (Vaccinierung) gegen den Spendererreger zu erzeugen.<sup>4)</sup>

10 Es ist weiter bekannt, dass rekombinante sogenannte „pseudotyped“ Viren ursprünglich nicht infizierbare Ziel-Zellen, -Gewebe, -Organe bzw. -Wirte infizieren können<sup>5)</sup>.

15 Basierend auf solchen Erkenntnissen wurde bereits der zielgerichtete Einsatz von gentherapeutischen Vektoren diskutiert<sup>6)</sup>.

20 In der Pharmakologie bedient man sich natürlicher und synthetischer Moleküle, wie beispielsweise des Asialofetuin bzw. poly-L-Lysin, um bestimmte Organe - im Falle der hier genannten Beispiele die Leber - aufgrund der Wechselwirkung mit organspezifischen Rezeptoren - im Falle der hier genannten Beispiele des Asialoglycoproteinrezeptors der Leber - mit diesen Molekülen selektiv für eine Therapie zugänglich zu machen<sup>7)</sup>.

25 Vor diesem Hintergrund stellt sich daher die Aufgabe, die therapeutische Nutzbarkeit der ausgezeichneten Immunogenen Wirkung von Parapoxvirus ovis dahingehend weiter zu verbessern, dass die oben beschriebene generalisierte paraspezifische Immunogenität des Parapoxvirus gezielt auf das erkrankte Organ-(system) und den Krankheits-Erreger gelenkt werden kann.

30 Eine solche Fokussierung ließe einen nebenwirkungsärmeren und am Wirkort stärkeren und nachhaltigeren therapeutischen Effekt erwarten.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, die immunologische Wirkung des Parapoxvirus zielgerichtet zu erzeugen. Die Aufgabe wird gelöst durch Koppeln oder das Einführen geeigneter Fremd-Peptide oder Proteine an bzw. in das Virus mit der Fähigkeit zur Interaktion mit Organ-, Gewebe- und/oder zellspezifischen Rezeptormolekülen.

So erreichten wir eine starke Fokussierung der Immunreaktion. Damit wird es erstmals möglich, mit Hilfe von Parapoxvirus ovis die komplexe Kapazität des Immunsystems am Ort des Bedarfs zu konzentrieren.

Die sich daraus ergebenden Vorteile bestehen in der Gewebe-, Organ-, bzw. Zellspezifität bei gleichzeitiger Verstärkung der immunologischen Wirkung am Ort des Bedarfs und in der Verringerung von Nebenwirkungen.

Da man mit den bisher bekannten Methoden/Produkten bei systemischer Applikation einerseits unerwünschte Nebenwirkungen allgemeiner Art in Kauf nehmen muss und/oder andererseits nur eine ungenügende Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort erreicht, kann man mit der hier dargestellten neuen Qualität von Parapoxvirus ovis gezielter und effektiver therapieren.

Für die Herstellung von rekombinantem Parapoxvirus ovis zur zielgerichteten organ-, gewebs- und/oder zell-spezifischen Immuntherapie kann man bekannte virale Proteine/Peptide verwenden, die sowohl unmodifiziert als auch modifiziert, verlängert, oder verkürzt sein können. Als in diesem Zusammenhang besonders geeignet hat sich dabei z.B. das große Hüllprotein des humanen Hepatitis B Virus (HBV) zum Erreichen der Leber erwiesen.

Weiter können nichtvirale Proteine/Peptide, insbesondere das Asialoglycoprotein, zur zielgerichteten Therapie der Leber verwendet werden.



Möglich ist auch die Verwendung neuer synthetischer Proteine/Peptide deren Sequenzen mittels dem Fachmann geläufiger Techniken zum Beispiel aus Phagen-Bibliotheken identifiziert werden können <sup>8)</sup>.

- 5      Zusätzlich zu den erwähnten Peptiden oder Proteinen können immunmodulatorische Epitope beispielhaft ausgewählt aus Hepatitis B Virus oder anderen Viren, oder tumorassoziierte Antigene, in das Parapoxvirus einkloniert werden.

10      Damit wird eine starke, spezifische immunstimulatorische Eigenschaft gegen den Erreger oder den Tumor in das Parapoxvirus eingeführt.

Die Identifizierung geeigneter Epitope erfolgt mit bekannten, dem Fachmann geläufigen Techniken, wie beispielsweise der Flowzytometrie <sup>9)</sup>.

- 15      Die Herstellung und Charakterisierung neuer rekombinanter Viren mit den beschriebenen Eigenschaften kann beispielhaft, wie im Folgenden aufgeführt, durchgeführt werden:

20      Herstellung eines rekombinanten Virus, dem Sequenzen fehlen, deren Genprodukte oder Teile davon nicht für die immunmodulatorische Wirkung oder für die Virusreplikation notwendig sind.

25      Ein Beispiel für die Klonierung des rekombinanten Parapoxvirus ovis geht von der Konstruktion von Doppelselektionskassetten aus, die ein Markergen, z. B. das LacZ-Gen unter Kontrolle des Vaccinia 11K-Gens oder einer anderen geeigneten Sequenz und ein anderes Selektionsmarkergen, z.B. das gpt-Gen (kodiert für das Enzym Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, XGPRT) unter Kontrolle des entsprechend geeigneten Promotors exprimieren. Die Deletion viraler Sequenzen kann dann beispielhaft wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt werden:

30

Singuläre Restriktionsschnittstellen in einem sowohl für die virale Replikation, als auch für die immunmodulatorische Wirkung nicht essentiellen Bereich von Parapoxvirus ovis, ein geeignetes Hüllprotein-Gen, ein anderes Gen, das für ein Strukturprotein kodiert (nachfolgend geeignetes Gen genannt) oder ein anderes Gen, z.B. VEGF-Gen, werden als Startpunkte verwendet, um eine bidirektionale Deletion von Sequenzen durch Einwirkung der Endonuklease Bal31 zu bewirken.

Hierzu wird beispielsweise das entsprechende Plasmid, ein geeignetes Strukturprotein-Gen, das die Nukleinsäuresequenz aus Parapoxvirus ovis enthält, im VEGF-Gen mit einem geeigneten Restriktionsenzym geöffnet und das nunmehr linearisierte Plasmid mit Bal31 inkubiert. Geeignete Deletionsplasmide werden aufgefüllt und hierauf komplementäre Oligonukleotide, die neue singuläre Schnittstellen, z.B. SmaI, SalI und EcoRV-Restriktionsschnittstellen darstellen, an die mit glatten Enden versehenen Bal 31-Produkte ligiert.

Nach der Transformation von Bakterien kann die Plasmid-DNA isoliert und mit einem Enzym gespalten werden, das in der Sequenz des entsprechenden Parapoxvirus ovis DNA-Fragmentes keine Erkennungsstelle enthält. Nach Insertion der mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen LacZ/gpt-Selektionskassette in die Deletionsstelle im geeigneten Gen kann die genaue Größe der erzeugten Deletionen in jeder resultierenden rekombinanten Plasmid-DNA durch Sequenzieren bestimmt werden.

Das Virus, dem dann das entsprechende Genprodukt oder eines Teiles davon fehlt, kann beispielhaft wie folgt hergestellt werden:

Konfluent ausgewachsene geeignete Zellen wie beispielsweise Rindernierenzellen werden mit einer Infektionsdosis von ca. 0,1 Multiplicity of infection (moi) infiziert. Nach etwa zwei Stunden werden die infizierten Zellen mit einem wie oben beschriebenen hergestellten Deletionsplasmid (z.B. 10 µg) beispielsweise unter Verwendung dem Fachmann geläufiger und kommerziell erhältlicher Transfektionssysteme transfiziert. Anschließend werden diese Zellkulturen mit einem geeigneten Selektions-

medium (z.B. mit HAT-Medium [Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin], MPA [Mycophenolsäure]) während 3 bis 6 Tagen bei ungefähr 37°C und etwa 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert bis ein zytopathischer Effekt (cpe) oder Plaquebildung sichtbar wird. Dann werden die Zellen lysiert, eine Verdünnungsreihe aus dem Zelllysate hergestellt und ein Plaque-Test auf geeigneten Zellen durchgeführt. Für den Plaque-  
5 test wird ein Agarosemedium-Gemisch zugegeben, das beispielsweise ungefähr 0,3 mg/ml Bluo-Gal (GIBCO) enthalten kann um blaue Plaques zu identifizieren, die z.B. LacZ-exprimierende, MPA-resistente rekombinante Viren enthalten. Die so erhaltenen rekombinanten Viren werden zur Infektion von geeigneten Zellen wie  
10 beispielsweise Rindernierenzellen, eingesetzt und mindestens zwei weiteren Plaque-titrationen unterzogen bis eine möglichst homogene, am günstigsten >99,9%ige, rekombinante Viruspopulation vorliegt.

Herstellung eines rekombinanten Virus, das Sequenzen enthält, deren Genprodukte  
15 oder Teile davon für ein organ-, gewebs- oder zellspezifisches Targeting notwendig sind.

Für die Herstellung des rekombinanten Virus mit Targetingsequenzen geht man analog vor. Als Ausgangsvirus wird ein wie oben beschrieben verändertes Virus ver-  
20 wendet. Alternativ kann der Einbau der Targetinsequenz in ein nicht genetisch verändertes Virus erfolgen, wenn die Virusreplikation und/oder die immun-modulatorische Wirkung nicht negativ beeinflusst werden. Anstelle des Plasmids, das deletierte oder verkürzte Sequenzen von Parapoxvirus ovis enthält, verwendet man ein entsprechendes Plasmid, das eine unveränderte oder in geeigneter Weise veränderte  
25 DNA-Sequenz enthält, die für ein Protein oder Peptid kodiert, das ein organ-, gewebs- und/oder zellspezifisches Targeting des rekombinanten Virus in nicht inaktivierter oder in inaktivierter Form ermöglicht. Dies kann z.B. für den Fall, dass man das rekombinante Virus in die Leber bringen möchte, beispielsweise die Sequenz für das große Hüllprotein des Hepatitis B Virus des Menschen oder eine andere geeignete  
30 Sequenz sein. Erfolgt der Einbau der Targetingsequenz in ein Gen, das nicht für ein

strukturelles Protein kodiert, so kann man die Targetingsequenz mit entsprechenden Membranankern koppeln, um einen Einbau in die Virushülle zu ermöglichen.

Die Wahl der Selektionsmarker ist bei der Herstellung so zu treffen, dass man nicht  
5 oder nur in geeigneter Art und Weise mit bereits vorhandenen Selektionsmarkern interferiert.

Analog können zusätzlich Sequenzen eingeführt werden, die für immunologisch aktive Epitope kodieren. Solche Epitope können mit dem Fachmann bekannten  
10 Methoden ausgewählt werden <sup>9)</sup>.

Nachweis der Targetingeigenschaften des rekombinanten Virus.

Die neuen Eigenschaften des rekombinanten Virus werden einerseits bei diesem Virus mittels dem Fachmann bekannter geeigneter Methoden wie beispielsweise der  
15 Verwendung von Selektionsmarkern nachgewiesen und/oder dem Nachweis des neuen Proteins/Peptides erfolgt mittels Western-Blot., Andererseits kann ein funktioneller Nachweis erfolgen. Dieser wird an Zielzellen des Targeting geführt. Im Falle eines Lebertargeting mit einem rekombinanten Virus, das Asialoglycoprotein oder entsprechende Teile davon enthält kann dieser funktionelle Nachweis durch  
20 Bindung von rekombinantem Virus an Zellen, die den Asialoglycoprotein-Rezeptor exprimieren, nachgewiesen werden. Dies können humane Leberzellen oder Hepatomazellen (z.B. HepG2) sein, bei denen mit Asialoglycoprotein und rekombinantem Virus kompetitive Bindungsstudien durchgeführt werden können.

25 Zur Kontrolle erfolgen diese Studien auch an Zellen, die den Asialoglycoproteinrezeptor nicht exprimieren, beispielsweise Fibroblasten. Die Targetingeigenschaften sind sowohl bei inaktivierten als auch bei nicht inaktivierten rekombinanten Viren vorhanden. Für eine Therapie werden allerdings nur solche rekombinante Viren verwendet, bei denen die Targetingeigenschaften entsprechend der therapeutischen  
30 Zielstellung nachgewiesen werden konnten.

### Nachweis der immunmodulatorischen Eigenschaften

Der Nachweis der immunmodulatorischen Eigenschaften des rekombinanten Virus kann experimentell beispielsweise in Mäusen erfolgen. Dafür wird Mäusen beispielsweise Balb/c Mäusen, das rekombinante Virus in inaktivierter oder nicht inaktivierter Form beispielsweise in eine Körperhöhle, z.B. intraperitoneal oder subcutan, intramuskulär oder intravenös, injiziert. Nach einem festzulegenden Zeitschema, beispielsweise 6, 12, 24 Stunden nach der Applikation, werden die Tiere getötet, und es werden Organe und/oder Zellen, beispielsweise Zellen, die durch peritoneale Lavage gewonnen werden, entnommen. Aus den Organen/Zellen wird genetisches Material wie beispielsweise RNA isoliert und die Zytokinexpression mittels geeigneter Methoden wie beispielsweise durch Semiquantitative oder quantitative PCR bestimmt.

Für eine Therapie werden dann diejenigen rekombinante Viren verwendet, bei denen die immunmodulatorischen Eigenschaften (Induktion einer Th1 Immunantwort) einen therapeutischen Effekt erwarten lassen.

Unter Zugrundelegung der bekannten Zusammenhänge vom Einfluss einer Th1 Immunantwort auf latente und chronisch persistente Virusinfektionen<sup>10,11)</sup>.

und der im Vergleich zu nichtrekombinanten Parapoxvirus ovis ähnlichen oder besseren immunmodulatorischen Eigenschaften des rekombinanten Parapoxvirus ovis ist der Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zell-spezifischem rekombinanten Parapoxvirus ovis als Monotherapie oder in Kombination mit biologisch aktiven (z.B. antiviralen), niedermolekularen Verbindungen oder biologisch aktiven Proteinen an Mensch und Tier möglich und von therapeutischem Nutzen zur antiviralen Therapie von vorwiegend chronischen Infektionen mit dem Hepatitis B Virus; anderen viralen Infektionen der inneren Organe, namentlich der Leber, wobei beispielhaft das Hepatitis C Virus (HCV), oder alle anderen Erreger aus der Gruppe der Hepatitis verursachenden Viren genannt seien<sup>12)</sup>, Infektionen, auch in Begleitung anderer Erkrankungen, mit den verschiedenen Typen des Herpes simplex Virus (HSV); den verschiedenen Typen von humanem Papillomvirus (HPV); dem humanem Immun-

defizienzvirus (HIV); dem humanem Cytomegalievirus (HCMV); sowie den entsprechenden Viruserkrankungen beim Tier.

5 Des Weiteren können mit dem rekombinanten Parapox virus aufgrund des gezeigten Wirkmechanismus insbesondere die folgenden prophylaktischen oder therapeutischen Behandlungen erfolgversprechend durchgeführt werden:

10 Verhinderung von Rekurrenzen bei Herpesvirus-Infektionen, Metaphylaxe, d.h. Verhinderung der Etablierung von viralen Infektionen (z.B. HIV), wenn unmittelbar nach der Exposition mit dem Mittel behandelt wird <sup>13)</sup>. Die Behandlung von Krebs ist aufgrund des Wirkmechanismus ebenfalls möglich <sup>14, 15)</sup>. Auch in diesen genannten Indikationen ist der Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezifischen rekombinanten Parapoxviren ovis als Monotherapie oder in sinnvoller Kombination mit biologisch aktiven, niedermolekularen Verbindungen möglich.

15 Die Behandlung entzündlicher und nichtentzündlicher degenerativer und proliferativer Erkrankungen der Leber wie beispielsweise der Leber-Zirrhose, und/oder der Leber-Fibrose mit rekombinantem Parapoxvirus ovis ist ebenfalls möglich. Auch in diesen genannten Indikationen ist der Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezifischen rekombinanten Parapoxviren ovis als Monotherapie oder in sinnvoller Kombination mit biologisch aktiven, niedermolekularen Verbindungen möglich.

20

25 Entsprechend der klinischen Fragestellung (z.B. chronische Hepatitis B Virus Erkrankung des Menschen) wird rekombinantes Virus zur organ- gewebs- und/oder zell-spezifischen Therapie hergestellt.

30 Man verfährt so, dass Gene, die nicht für eine Induktion einer zellvermittelten Immunantwort notwendig sind, deletiert oder mutiert werden. In diese Gene oder freien Genabschnitte setzt man dann die für Epitope (Peptide/Proteine) kodierenden Gensequenzen ein, die eine spezifische Interaktion mit einem oder mehreren Rezeptoren auf den Ziel-Zellen-Geweben oder -Organen gewährleisten. Alternativ

kann man die für entsprechende Epitope kodierenden Gensequenzen in genetisch unveränderte Parapoxviren einsetzen, wenn die Virusreplikation, die Virusreifung und/oder die immunmodulaten Eigenschaften nicht negativ beeinflusst werden.

- 5      Zusätzlich kann durch geeignete immunologisch wirksame Epitope (z.B. Epitope des HBV), die zellvermittelte Immunantwort gegen einen Erreger spezifisch verstärkt werden.

- 10      Dazu wird das organ-, gewebs- und/oder zell-spezifisch interagierende/bindende rekombinante Parapoxvirus ovis zusätzlich mit spezifischen gegen einen oder mehrere Erreger gerichteten,- Immunantwort potenzierenden Epitopen ausgestattet und in der betreffenden Indikation eingesetzt (beispielsweise gegen eine oder mehrere der oben genannten Viruserkrankungen wie beispielsweise der chronische Hepatitis B Erkrankung des Menschen). Alternativ kann man die für entsprechende
- 15      Epitope kodierenden Gensequenzen in genetisch unveränderte Parapoxviren einsetzen, wenn die Virusreplikation, die Virusreifung und/oder die immunmodulaten Eigenschaften nicht negativ beeinflusst werden.

- 20      Je nach klinischer Fragestellung bzw. ätiologisch beteiligtem Virus wird das rekombinante Parapoxvirus ovis in inaktivierter oder nicht inaktivierter Form systemisch (z.B. intramuskulär, subcutan, intraperitoneal, intravenös) oder lokal (z.B. in das betreffende Organ) appliziert.

- 25      Das rekombinante Parapoxvirus ovis liegt dabei entweder lyophilisiert vor und wird unmittelbar vor der Applikation in einem geeignetem Lösungsmittel suspendiert oder aber es liegt in einer anderen geeigneten Formulierung vor.

- 30      Mehrere Applikationen bis hin zur kontinuierlichen Infusion nach Zeitschemen, die den Erfordernissen der klinischen Fragestellungen entsprechen, können dabei notwendig sein.

Der Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezifischen Parapoxviren ovis kann als Monotherapie oder in Kombination mit biologisch aktiven niedermolekularen Verbindungen entsprechend der Indikation und/oder der klinischen Fragestellung erfolgen.

5

Bei einer Kombination mit biologisch aktiven niedermolekularen Verbindungen kann die Applikation zeitgleich oder zeitlich versetzt erfolgen. So ist es beispielsweise möglich, zunächst mit einer niedermolekularen Verbindung (z.B. Nukleoidanalogen oder anderen Verbindungen) eine virale Replikation zu verringern oder zu verhindern und anschließend mit dem rekombinanten Parapoxvirus ovis eine virale Clearance herbeizuführen. Bei einer solchen Kombinationstherapie ist der Einsatz z.B. auch bei akuten viralen Infektionen möglich.

10



### Beispiel

für die Herstellung und Testung einer Targeting-Mutante für den Herpes Virus Entry Mediator

5

10

15

Das Glycoprotein D (gD) des bovinen Herpesvirus 1 (BHV-1) ist an der Bindung des Virus an seine Zielzelle und für die Penetration des Virus in die Zielzelle verantwortlich, wobei hierbei noch andere virale Glycoproteine beteiligt sind (Liang et al. 1991). Neutralisierende gD spezifische Antikörper üben ihre Funktion aus, indem sie einen auf die Adsorption des Virus folgenden Schritt, die Penetration stören (Okazaki et al. 1986). gD dient somit als virale Bindungsstelle für den Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) (Montgomery et al. 1996). Zellen, die diesen Herpesvirus Entry Mediator nicht besitzen, sind resistent gegen eine Infektion mit verschiedenen Herpesviren, z.B. humanes Herpesvirus 1 [HSV-1] oder BHV-1. Verschiedene BHV-1-Stämme, die gD unterschiedlich stark exprimieren, penetrieren die Zellen unterschiedlich stark, wobei eine positive Korrelation zu dem gD Gehalt besteht (Fehler, 1991).

20

25

Rekombinantes Parapoxvirus ovis, das gD an der Oberfläche trägt, kann man nutzen, um solche HVEM-Bindungsstellen auf Zellen, die HVEM exprimieren (z.B. MDBK-Zellen) zu targeten. Infiziert man diese Zellen mit BHV-1, rekombinantem Parapoxvirus, welches gD exprimiert oder Wildtyp-Parapoxvirus, so sollte das Targeting des HVEM über die Penetrationsgeschwindigkeit meßbar sein. Dabei wird erwartet, dass gD rekombinantes Parapoxvirus etwa genauso schnell wie BHV-1, in jedem Falle jedoch schneller als Parapoxvirus ovis Wildtyp, der MDBK-Zellen ebenfalls infizieren kann, in die Zellen penetriert.

#### Herstellung der LacZ Mutante:

In Parapoxvirus ovis (Strain D 1701) wurden die im Genom doppelt vorhandenen vegf-Gene nahezu vollständig deletiert und an diesen Stellen jeweils eine lacZ-xgpt  
5 Expressionskassette von E.coli eingefügt (Rziha et al. 1999).

#### Herstellung des Transfektionsplasmides für die homologe Rekombination:

Das gD-Gen aus BHV1 einschließlich seiner Signalsequenz und Membrananker  
10 (Tikoo et al. 1990) wurde über PCR amplifiziert und blunt end in die EcoRV Site des Vektors pDVRec (Rziha et al. 1999) kloniert. Die Übereinstimmung der gD-Sequenz in pDVRec mit der Ursprungssequenz wurde durch Sequenzierung (MWG Biotech) bestätigt.

#### 15 Transfektion:

Die Transfektion der Parapoxvirus lacZ-Mutante (D1701-RV) erfolgte mit dem isolierten Plasmid pDVRec/gD und BKKL3A-Zellen. Bei einem Monolayer der Zellen von 70 bis 80 % (6-Well-Platte: Zellzahl von ca.  $4 \times 10^5$  pro Well) wurde die  
20 Transfektion durchgeführt. Als Transfektionsreagenz diente das Liposomale Transfektionsreagenz DOSPER. Die Zellen wurden mit der Parapoxvirus lacZ-Mutante in einer MOI von 0,1 infiziert. 2 µg Plasmid-DNA wurden im Verhältnis 1:3 und 1:4 mit DOSPER gemischt und nach der Virusinfektion den Zellen zugegeben.

25 4 bis 7 Tage nach der Transfektion zeigten die Zellen einen virus-spezifischen cytopathogenen Effekt und das Virus wurde durch dreimaliges Frieren und Tauen geerntet.

## Plaquereinigung:

5 BKKL3A Zellen wurden mit dem in Zehner Schritten verdünnten rekombinanten Virus ( $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$ ) infiziert. Die Wells bei denen nach einigen Tagen ca. 10 bis 30 beginnende Virusplaques zu sehen waren, wurden mit Agarose-Bluo-Gal 300  $\mu\text{g/ml}$  (GIBCO) überschichtet. Nach 24 bis 48 h Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  (5 %  $\text{CO}_2$ ) erfolgte das Picken der weissen Plaques. Das Virusmaterial des ausgestanzten Agarose-blockes wurde über Nacht in Medium eluiert und das Virus erneut vermehrt (1. Plaquereinigung). Nach der ersten Plaquereinigung wurden die Klone im Dot Blot  
10 mit einer  $\text{P}^{32}$  markierten gD-DNA Sonde hybridisiert. Die Aufreinigung der positiven Rekombinanten erfolgt durch mindestens dreimalige Plaquereinigungsschritte.

## Penetrationsassay:

15

Bovine Nierenzellen (MDBK, ATCC No. CCL-22) wurden entsprechend den Anweisungen von ATCC gezüchtet und waren bei Versuchsbeginn konfluent. Die Zellen wurden 5 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und vorgekühltes ( $4^{\circ}\text{C}$ ) a) BHV-1, b) gD rekombinantes Parapoxvirus  
20 oder c) Parapoxvirus ovis Wildtyp auf die Zellen gegeben (MOI 0.01). Danach wurden die Zellen 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, das Medium abgesaugt und die Zellen 1x mit kaltem ( $4^{\circ}\text{C}$ ) PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Zellen weiter in  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Medium weiter im Brutschrank inkubiert.

25 Nach 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten wurde jeweils 1 well für ca. 45 Sekunden mit Zitratpuffer gewaschen, ein jeweiliges Kontrollwell mit PBS. Damit wurden die Viren, die bis dahin noch nicht in die Zellen penetriert sind, inaktiviert. Somit erhält man eine Penetrationskinetik. Die Zellen wurden nach den Säurebehandlungen mit Medium (das 0,5 % Methylzellulose enthält) überschichtet. Nach 3 Tagen wurden die  
30 Zellen fixiert, gefärbt und die Plaques mit einer Skala von 0 bis ++++ in einem Plaquerviewer bestimmt.

**Ergebnis:**

5 Es zeigte sich, dass bei BHV-1 und gD rekombinantem Parapoxvirus ovis (gDPPVO) bereits nach ca. 7 Minuten mehr als die Hälfte der Viren die Cytoplasmamembran penetriert hat, während der Parapoxvirus ovis Wildtyp (wt PPVO) dafür ca. 20 Minuten benötigt. Diese Unterschiede sind signifikant (Varianzanalyse mit post hoc Vergleich). Damit konnte gezeigt werden, dass a) die Expression eines Proteins an der Oberfläche von Parapoxvirus ovis möglich ist und dass b) dieses Protein zum  
10 Targeten von spezifischen Rezeptoren, die wiederum auf bestimmten Zellen und/oder bestimmten Geweben exprimiert werden, benutzt werden kann.

1. Guidotti et al. (1996): Viral cross talk: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver
- 5 2. Guidotti et al. (1994): Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice
3. Steinmassl, G., G. Wolf (1990): Bildung von Interleukin 2 und Interferon- $\gamma$  durch mononukleäre Leukozyten des Schweines nach in vitro-Stimulation mit verschiedenen Viruspräparaten. J.Vet.Med.B37,5,321-331
- 10 4. Robinson, A.J. and Lyttle, D.J. (1992): Parapoxviruses: their biology and potential as recombinant vaccines. In: Recombinant Poxviruses, Chapter 9, 306-317 eds. M. Binns and G. Smith CRC Press, Boca Raton und WO 97/37031
- 15 5. Ishikawa, T. and Ganem, D. (1995): The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 92 (14):6259-6263
- 20 6. Harris, J.D. and Lemoine, N.R. (1996): Strategies for targeted gene therapy. Trends in Genetics 12 (10): 400-405
7. Rensen, P.C.N., de Vrueth, L.A. and van Berkel, T.J.C.(1996): Targeting Hepatitis B Therapy to the Liver. Clin. Pharmacokinet. 31 (2)131-155
- 25 8. Barry, B.A., Dower, W.J. and Johnston, S.A. (1996): Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. Nature Medicine 2 (3):299-305
- 30 9. Kern, F., Surel, I.P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P.,

Volk, H.D. (1998): T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat. Med.* 4 (8): 975-978

- 5 10. P. Lucin, S. Jonjic, M. Messerle, B. Polic, H. Hengel, U.H. Koszinowski (1994): Late-Phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J. Gen. Virol* 75:101-110; P.M.
- 10 11. Smith, R.M. Wolcott, R. Chervenak, S.R. Jennings (1994): Control of acute cutaneous herpes-simplex virus-Infection - T-cell mediated viral clearance is dependent upon interferon gamma. *Virology* 202 (1):76-88]
- 15 12. Y. Kawanashi, N. Hayashi, K. Katayama, K. ueda, T. Takehara, E. Miyoshi, E. Mita, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada (1995): Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma inhibit synergistically viral replication in hepatitis B virus replicating cells. *J. Medical Virology* 47 (3):272-277
- 20 13. Dhawan, S., L.M. Wahl, A. Heredia, Y.H. Zhang, J.S. Epstein, M.S. Meltzer, I.K. Hewlett (1995): Interferon gamma inhibits HIV-induced invasiveness of Monocytes. *J. Leukocyte Biology*, 58 (6):713-716
- 25 14. J.F. Bromberg, C.M. Horvath, Z.L. Wen, R.D. Schreiber, J.E.Darnell (1996): Transcriptionally active stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *PNAS* 93(15):7673-7678;
- 30 15. M.Klouche, H.Kirchner, F.Holzel (1994): Antiproliferative effects of interferon gamma in combination with alpha-difluoromethylornithine on human carcinoma cell cultures. *J.Cancer Research and Clinical Oncology* 120(12):706]

16. Fehler F (1991): Glycoprotein IV des bovinen Herpesvirus 1: funktionelle und strukturelle Eigenschaften eines essentiellen herpesviralen Glycoproteins  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 5 17. Liang X, Babiuk L A, van Drunen, Little, Van den Hurk S, Fitzpatrick D R, Zamö T J (1991): Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by ist major glycoproteins gI, gIII and gIV. J. Virol. 65:1124-1132.
18. Montgomery R I, Warner M W, Lum B J, Spear P G (1996) Cell 87:427
- 10 19. Okazaki K, Honda E, Minetoma T, Kumagai T (1986): Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. Virology 150:260-264
- 15 20. Rziha H-J, Henkel M, Cottone R, Meyer M, Dehio C, Büttner M (1999): Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. Journal of Biotechnology, Vol. 73, 235-242
- 20 21. Rziha H-J, Henkel M, Cottone R, Bauer B, Auge U, götz F, Pfaff E, Büttner M (1999): Generation of recombinant Parapoxviruses: Non-essential genes suitable for foreign gene expression. Journal of Biotechnology (1.09.99) ??
- 25 22. Tikoo S K, Fitzpatrick D R, Babiuk l A, Zamb T J (1990): Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of functional bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein gIV in Transfected Bovine Cells . Journal of Virology, Vol. 64, No.10, 5132-5142

**Patentansprüche**

1. Verwendung von rekombinantem Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften zur Herstellung von Arzneimitteln.
2. Arzneimittel enthaltend rekombinantes Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften.



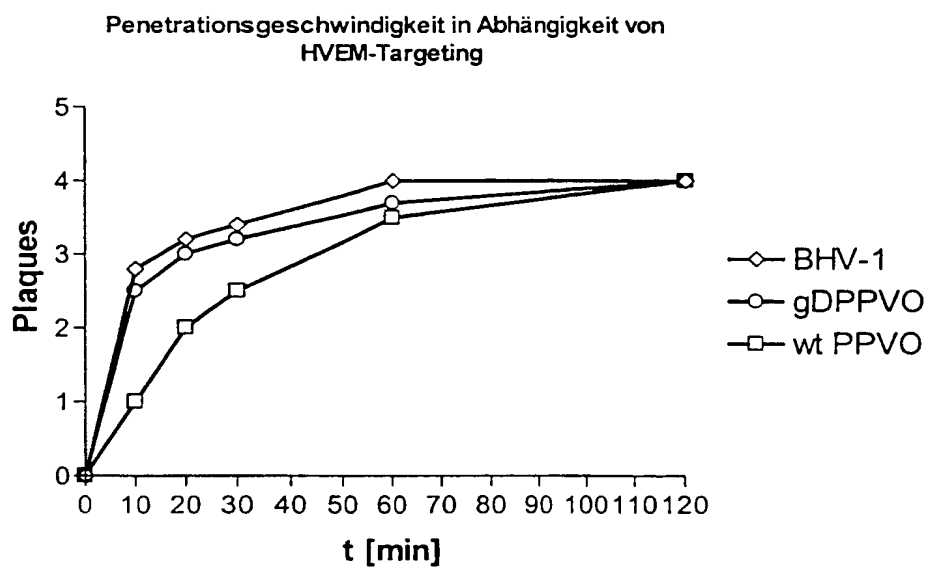


Fig. 1



5  
7  
7

▲  
.  
B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/EP 00/04011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/86 A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, BIOSIS, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | DE 44 05 841 C (MAYR)<br>5 January 1995 (1995-01-05)<br>the whole document   | 1,2                   |
| A          | DE 196 39 601 A (BAYER AG)<br>4 September 1997 (1997-09-04)<br>the whole document  | 1,2                   |
| A          | WO 97 37031 A (UNIVERSITY OF OTAGO)<br>9 October 1997 (1997-10-09)<br>the whole document   | 1,2                   |
| A          | J. HARRIS ET AL.: "Strategies for<br>targeted gene therapy"<br>TRENDS IN GENETICS,<br>vol. 12, no. 10, 1996, pages 400-405,<br>XP000961250<br>page 400 -page 402 | 1,2                   |

---  
-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

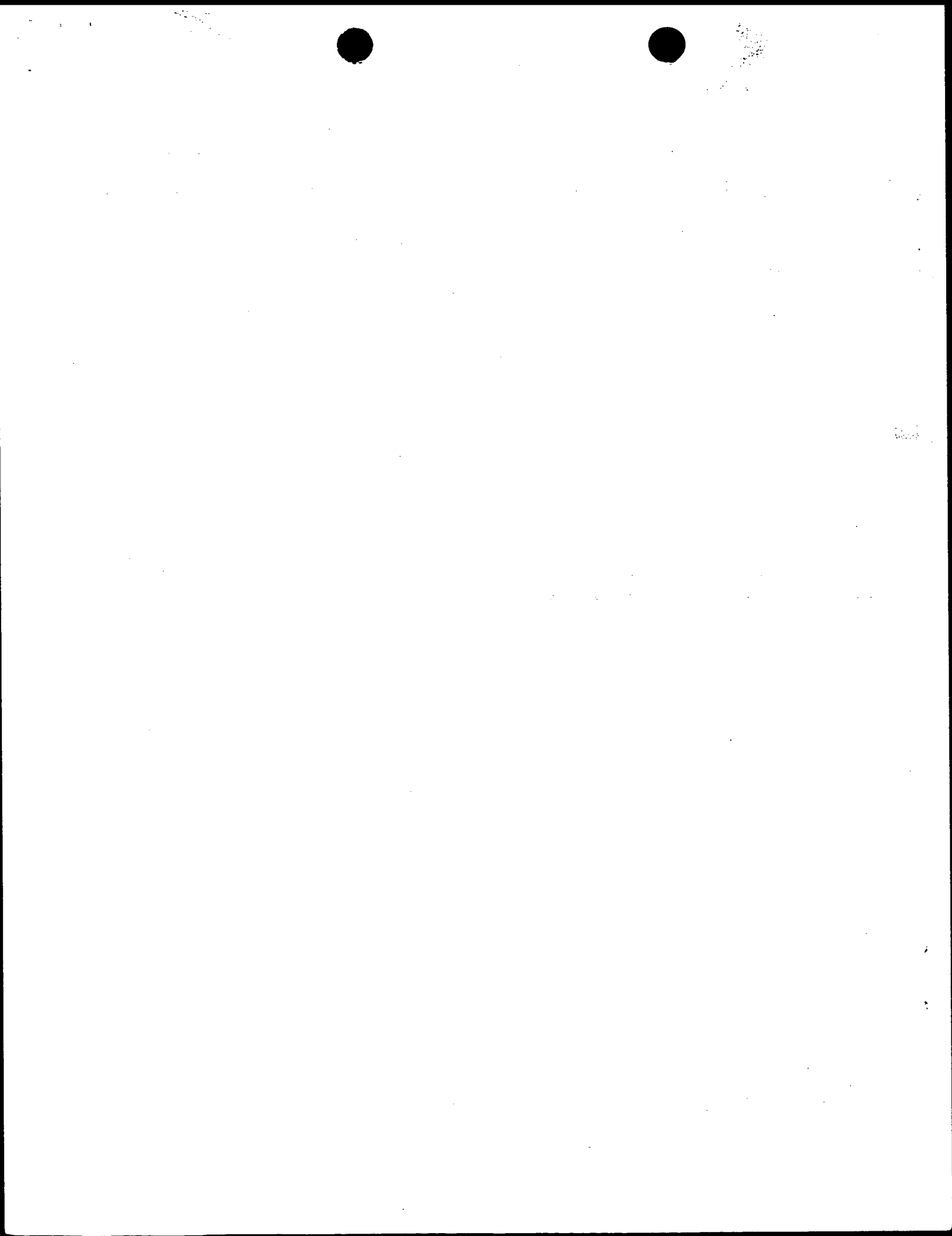
12/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Skelly, J



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/EP 00/04011

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 4405841                                | C | 05-01-1995          | AT 153242 T                | 15-06-1997          |
|   |   |                     | AU 690625 B                | 30-04-1998          |
|   |   |                     | AU 1416795 A               | 11-09-1995          |
|   |   |                     | BR 9506882 A               | 19-08-1997          |
|   |   |                     | CA 2182207 A               | 31-08-1995          |
|   |   |                     | CN 1142187 A               | 05-02-1997          |
|   |   |                     | DE 59402826 D              | 26-06-1997          |
|   |   |                     | DK 669133 T                | 14-07-1997          |
|   |   |                     | WO 9522978 A               | 31-08-1995          |
|   |   |                     | EP 0669133 A               | 30-08-1995          |
|   |   |                     | ES 2102081 T               | 16-07-1997          |
|   |   |                     | FI 963277 A                | 22-08-1996          |
|   |   |                     | GR 3023508 T               | 29-08-1997          |
|   |   |                     | HU 75545 A                 | 28-05-1997          |
|   |   |                     | JP 2873880 B               | 24-03-1999          |
|   |   |                     | JP 9504803 T               | 13-05-1997          |
|   |   |                     | KR 196204 B                | 15-06-1999          |
|   |   |                     | NO 963462 A                | 20-08-1996          |
|   |   |                     | NZ 278079 A                | 26-01-1998          |
|   |   |                     | PL 316024 A                | 23-12-1996          |
|   |   |                     | SI 669133 T                | 31-10-1997          |
| DE 19639601                               | A | 04-09-1997          | AU 718141 B                | 06-04-2000          |
|   |   |                     | AU 1725797 A               | 16-09-1997          |
|   |   |                     | BR 9707785 A               | 27-07-1999          |
|   |   |                     | CA 2247336 A               | 04-09-1997          |
|   |   |                     | CN 1217027 A               | 19-05-1999          |
|   |   |                     | WO 9732029 A               | 04-09-1997          |
|   |   |                     | EP 0886679 A               | 30-12-1998          |
|   |   |                     | HU 9901035 A               | 28-07-1999          |
|   |   |                     | JP 2000507092 T            | 13-06-2000          |
|   |   |                     | NO 983946 A                | 22-10-1998          |
|   |   |                     | PL 328870 A                | 01-03-1999          |
|   |   |                     | SK 120098 A                | 10-03-1999          |
| WO 9737031                                | A | 09-10-1997          | AU 2182697 A               | 22-10-1997          |
|   |   |                     | BR 9708401 A               | 04-01-2000          |
|   |   |                     | CA 2250041 A               | 09-10-1997          |
|   |   |                     | CN 1217751 A               | 26-05-1999          |
|   |   |                     | EP 0904393 A               | 31-03-1999          |
|   |   |                     | HU 9902438 A               | 29-11-1999          |
|   |   |                     | JP 2000507449 T            | 20-06-2000          |

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | H.J. RHIZA ET AL.: "parapoxviruses:<br>potential alternative vectors for<br>directing the immune response in<br>permissive and non-permissive hosts"<br>J. BIOTECHNOL.,<br>vol. 73, 1999, pages 235-242, XP000961259<br>cited in the application<br>the whole document  | 1,2                   |
| A          | M. BÜTTNER AT AL.: "Interferon induction<br>in peripheral blood mononuclear leukocytes<br>of man and farm animals by poxvirus vector<br>candidates and some poxvirus constructs"<br>VET. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL.,<br>vol. 46, 1995, pages 237-250, XP000961253<br>cited in the application<br>the whole document | 1,2                   |

**Translation**

PATENT COOPERATION TREA

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

9

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>Le A 33 771- WO Bu                               |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/EP00/04011   | International filing date (day/month/year)<br>04 May 2000 (04.05.00) | Priority date (day/month/year)<br>14 May 1999 (14.05.99)  |  |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61K39/00 |  |   |  |
| Applicant<br>BAYER AKTIENGESELLSCHAFT   |  |   |  |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.  
  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

|   |   |
|---|---|
| Date of submission of the demand<br>10 November 2000 (10.11.00) | Date of completion of this report<br>15 May 2001 (15.05.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                         | Authorized officer  |
| Facsimile No.   | Telephone No.   |





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/04011

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-19, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-2, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

|                               |        |     |     |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-2 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-2 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-2 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following documents:

- D1 = DE-C-44 05 841 (MAYR), 5 January 1995;  
D2 = DE-A-196 39 601 (BAYER AG), 4 September 1997;  
D3 = WO-A-97/37031 (UNIVERSITY OF OTAGO), 9 October 1997;  
D4 = TRENDS IN GENETICS, Vol. 12, 1996,  
pages 400-405, (Harris, J.D. and Lemoine,  
N.R.) mentioned in the application.

**1. NOVELTY**

The present application is novel under PCT Article 33(2) because the available prior art discloses no recombinant parapox viruses with targeting properties.

**2. INVENTIVE STEP**

The present application appears to satisfy the requirements of PCT Article 33(3) for the following reasons:



2.1 Document D2, which is considered to be the closest prior art, discloses recombinant parapox viruses and their use to produce medicaments (abstract; page 2, lines 3-10; Claims 1-12, 40 and 44). The subject matter of the present **Claim 1** differs therefrom in that the recombinant parapox virus has targeting properties. This difference effects that the viruses used infect specific target cells, tissue, organs or hosts and therefore have milder side effects and a stronger therapeutic effect at the site of action. The problem addressed by Claim 1 of the present invention can thus be seen as the use of recombinant parapox viruses to produce improved medicaments.

The solution proposed in the present application can be considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) because the available prior art does not appear to indicate parapox viruses with targeting properties. Although recombinant viruses with such properties are known in principle (see for example, document D4, pages 400-401), the available prior art gives no indication of parapox viruses with targeting properties. A person skilled in the art would thus have no reason to add targeting properties to the recombinant parapox viruses known from D1-D3 and thereby to arrive at the subject matter of present Claim 1.

2.2 For similar reasons, the medicament claimed in present **Claim 2** appears to involve an inventive step (PC Article 33(3)).



## 3. INDUSTRIAL APPLICABILITY

The subject matter of Claims 1-2 appears to be industrially applicable and thus to satisfy the requirements of PCT Article 33(4).





**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The term "targeting properties" that is essential to the present invention appears to satisfy the requirements of PCT Article 6 because it has a definition generally known to a person skilled in the art and also is defined in the description (page 4, line 11 to page 5, line 10, example).

